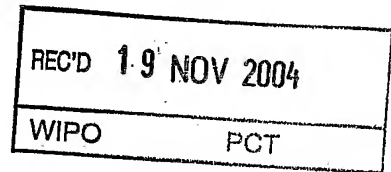


# BUNDESREPUBLIK DEUTSCHLAND



## Prioritätsbescheinigung über die Einreichung einer Patentanmeldung

**PRIORITY  
DOCUMENT**  
SUBMITTED OR TRANSMITTED IN  
COMPLIANCE WITH RULE 17.1(a) OR (b)

**Aktenzeichen:** 10 2004 007 646.4

**Anmeldetag:** 17. Februar 2004

**Anmelder/Inhaber:** IBIDI GmbH Gründerzentrum Physik, 80799 München/DE

**Bezeichnung:** Vorrichtung für Mikrofluiduntersuchungen

**IPC:** B 01 L, G 01 N, C 12 M

Die angehefteten Stücke sind eine richtige und genaue Wiedergabe der ursprünglichen Unterlagen dieser Patentanmeldung.

München, den 26. Oktober 2004  
**Deutsches Patent- und Markenamt**  
Der Präsident  
Im Auftrag

Schäfer

## Vorrichtung für Mikrofluiduntersuchungen

- 5 Die Erfindung betrifft eine Vorrichtung für Mikrofluiduntersuchungen mit einem Substrat mit planer Grundfläche und Deckfläche, insbesondere zum Mikroskopieren von Zellen sowie zur Molekülanalyse.

10 Mikroskopische Untersuchungen von Zellen (Bakterien) oder Molekülen werden herkömmlicherweise auf Objektträgern, Deckgläsern, Petrischalen, Multititerplatten oder in Zellkulturflaschen durchgeführt. Aus dem Stand der Technik sind weiterhin Trägersysteme mit Flüssigkeitsaufnahmen wie Reservoir oder Kanäle bekannt. Solche Trägersysteme sind beispielsweise in der DE 43 34 677 oder in der DE 201 16 019 offenbart. Dabei handelt es sich um zusammengeklebte Glassysteme oder Kunststoff-

15 kammern in Form eines Kanals, welche der optischen Mikroskopie zugänglich sind.

Diese Trägersysteme haben jedoch den Nachteil, dass nach Einfüllen einer Lösung mit den zu mikroskopierenden Partikeln, mit Ausnahme von Hinzufügen von Lösungen, keine Experimente, wie die Selektion bestimmter Partikel oder Migrationstudien, mehr durchgeführt werden können. Solche Experimente müssen vor Befüllen des

20 Trägersystems durchgeführt werden, was zum einen die gesamte Untersuchungsdauer verlängert und zum anderen die Gefahr eines Verunreinigens auf Grund des Umfüllens zur Folge hat.

Die der Erfindung zu Grunde liegende Aufgabe besteht daher darin, eine Vorrichtung für Mikrofluiduntersuchungen bereitzustellen, mit der Partikelversuche, wie Selektion bestimmter Partikel oder Migrationsversuche, und ein anschließendes Mikroskopieren in einfacher und genauer Weise durchgeführt werden können.

- 30 Diese Aufgabe wird gelöst durch den Gegenstand von Anspruch 1. Erfindungsgemäß wird also eine Vorrichtung für Mikrofluiduntersuchungen mit einem Substrat mit planer Grundfläche und Deckfläche bereitgestellt, wobei in das Substrat eine Kammer zur Flüssigkeitsaufnahme mit wenigstens zwei Zuführungen integriert ist und in der Kammer eine halb durchlässige oder durchlässige Membran angeordnet ist, wobei die

Kammer durch die Membran in zwei Teilkammern mit jeweils wenigstens einer Zuführung unterteilt wird.

5 Unter einer halbdurchlässigen Membran wird eine Membran verstanden, die nur von einer Seite durchlässig und/oder teilchenselektiv durchlässig ist.

10 In die erfindungsgemäße Vorrichtung können zunächst Teilchen in Lösung gefüllt werden, dann Untersuchungen mit Hilfe der Membran (beispielsweise Filter-, Dialyse- und/oder Migrationsuntersuchungen) und anschließend direkt mikroskopische Analysen durchgeführt werden.

15 Bei Filteruntersuchungen kann eine durchlässige oder poröse Membran vorgesehen sein, deren Pore oder Poren kleiner als die zu filternden Partikel (beispielsweise Bakterien) sind, so dass diese nicht durch die Membran gelassen werden. Für Dialyseuntersuchungen kann vorzugsweise eine halbdurchlässige (semipermeable) Membran vorgesehen sein, die beispielsweise für Zellen undurchlässig aber für Biomoleküle wie Proteine oder Salze durchlässig ist. Eine Teilkammer kann dann zur Kultivierung und Mikroskopie der Zellen bzw. Bakterien dienen. Weiterhin kann die erfindungsgemäße Vorrichtung für Migrationstudien, insbesondere Chemotaxis-Untersuchungen, verwendet werden, wobei zwischen horizontaler Chemotaxis (d. h., parallel zur durchlässigen Membran) und vertikaler Chemotaxis (d. h. senkrecht zur Membran) unterschieden wird.

20

30 Gemäß einer vorteilhaften Weiterbildung können die Teilkammern wenigstens teilweise parallel zueinander angeordnet sein. Dies kann durch eine geeignet ausgebildete Kammer und/oder eine geeignet angeordnete Membran erreicht werden. Durch einen parallelen Verlauf der Teilkammern wird eine große Grenzfläche zwischen den Teilkammern erhalten, wodurch der Teilchenaustausch beschleunigt durchgeführt werden kann.

Vorzugsweise können die Teilkammern in einer Ebene parallel oder senkrecht zur Grundfläche des Substrats angeordnet sein.

Gemäß einer vorteilhaften Weiterbildung kann die Membran wenigstens teilweise in einer Ebene parallel oder senkrecht zur Grundfläche des Substrats angeordnet sein. Damit sind dann die resultierenden Teilkammern wenigstens teilweise in einer Ebene senkrecht oder parallel zur Grundfläche des Substrats angeordnet, wobei diese Anordnung insbesondere je nach gewünschter Anwendung gewählt werden kann. Eine Anordnung von Teilkammern übereinander (Membran parallel zur Grundfläche) kann vorteilhaft sein, wenn beispielsweise eine Gravitationswirkung auf die Teilchen in Richtung der Membran gewünscht ist. Bei einer Anordnung der Teilkammern nebeneinander (Membran senkrecht zur Grundfläche) sind insbesondere beide Teilkammern in gleicher Weise einfach mit dem Mikroskop zugänglich.

Vorteilhafterweise kann die Membran flexibel, vorzugsweise elastisch, sein. Bei einer flexiblen (biegsamen) Membran lässt sich die Form der Teilkammern verändern; eine elastische Membran erlaubt durch Beaufschlagen der Membran mit Druck ein reversibles Verändern des Volumens der Teilkammern.

In einer vorteilhaften Weiterbildung kann die Membran wenigstens teilweise mit dem Boden der Kammer verbunden sein. Beispielsweise kann die Membran verklebt oder mittels Ultraschall-Bonden verbunden sein.

Vorzugsweise kann wenigstens ein Teil der Membran an einer Kammerwand, insbesondere dem Boden der Kammer, flächig anliegend lösbar angeordnet sein. Wenn die Membran an einer Kammerwand anliegt, ist sie durch diese Wand in einfacher Weise und direkt mikroskopisch zugänglich. Beispielsweise kann die Membran bei einer Untersuchung zunächst an einer Wand anliegen; dann wird eine Flüssigkeit mit zu untersuchenden Partikeln zwischen die Wand und die Membran gebracht, wodurch sich die Membran von der Wand löst. Ein Teil der Flüssigkeit und/oder der Partikel geht durch die Membran hindurch während ein anderer Teil an der Membran, beispielsweise in den Poren, hängen bleibt. Sobald der Druck durch die Flüssigkeit auf die Membran nachlässt, legt sich diese wieder, auf Grund ihrer Anordnung und/oder Elastizität, an die Wand der Kammer, so dass ihre Oberfläche mit den daran angeordneten Partikeln mikroskopisch untersucht werden kann.

Gemäß einer Weiterbildung der zuvor beschriebenen Vorrichtungen kann die Membran wenigstens eine Pore aufweisen, wobei jede Pore einen Porendurchmesser in einem vorbestimmten Teilbereich des Bereichs von 1 nm bis 20  $\mu\text{m}$ , vorzugsweise 0,5  $\mu\text{m}$  bis 20  $\mu\text{m}$ , aufweisen kann. Der Teilbereich kann insbesondere auch den gesamten genannten Bereich oder nur einen bestimmten Wert aus dem Bereich umfassen. Je nach Durchmesser oder Durchmesser-Verteilung der Poren kann die Teilchenselektivität der Membran und/oder der Fluss durch die Membran kontrolliert werden.

Die Membran der zuvor genannten Vorrichtungen kann vorzugsweise ein optisch hochwertiges Material umfassen. Mit einem optisch hochwertigen Material (d. h. ohne Doppelbrechung oder Autofluoreszenz) lassen sich in verbesserter Weise optische Untersuchungen insbesondere auf beiden Seiten der Membran durchführen.

Gemäß einer vorteilhaften Weiterbildung kann die Kammer wenigstens vier Zuführungen umfassen und durch die Membran in zwei Teilkammern mit jeweils wenigstens zwei Zuführungen unterteilt werden. Damit ist jede Teilkammer unabhängig von der anderen fluidisch adressierbar, d. h. jede der Kammern weist eine eigene Zufluss- und Abflussöffnung auf.

Vorteilhafterweise kann die Membran und/oder eine Kammerwand eine Oberflächenfunktionalisierung aufweisen. Damit können in einzelnen Bereichen bestimmte Vorgänge, wie Zellwachstum oder Adhäsion von Partikeln, begünstigt werden. Unterschiedliche Bereiche der Membran oder der Kammerwand können unterschiedliche Oberflächenfunktionalisierungen aufweisen.

Vorzugsweise kann die Oberflächenfunktionalisierung eine Beschichtung, insbesondere mit wenigstens einem Polyelektrolytenfilm, einem Adhäsionsfaktor, einer funktionellen Gruppe, einer Lipidmembran, einem Zellrasen und/oder einem Blockingmolekül, umfassen.

Die Polyelektrolytfilme können PAA (Polyacrylsäure), PEI (Polyethylendiimid) und/oder PSS (Polystyrolsulfonsäure) umfassen; die Biomoleküle können Proteine oder DNA und die Adhäsionsfaktoren können RGD-Peptide umfassen. Die funktionel-

le Gruppe kann  $\text{COOH}$  oder  $\text{NH}_2$  und das Blockingmolekül kann BSA, Gelatine oder DNA umfassen.

5 Vorzugsweise kann das Substrat der zuvor beschriebenen Vorrichtungen einen Kunststoff, insbesondere einen optisch hochwertigen und/oder einen optisch nicht transparenten Kunststoff, umfassen. Ein optisch hochwertiger (d. h. ohne Doppelbre-

10 chung oder Autofluoreszenz) Kunststoff reduziert störende Einflüsse des Substrats beispielsweise bei Fluoreszenz-Untersuchungen; durch die Verwendung eines optisch nicht transparenten Materials können Störungen auf Grund von außen einfallendem, unerwünschtem Licht vermieden werden.

15 Vorzugsweise kann das Substrat ein Deckenelement umfassen, in dessen Grundfläche eine Ausnehmung für die Kammer vorgesehen ist. Insbesondere kann die Ausnehmung in Form eines Grabens ausgebildet sein. Dies ermöglicht eine einfache Herstellung des Substrats.

Das Deckenelement kann eine Deckplatte sein. Das Deckenelement ist in diesem Fall ein Stück und lässt sich einfach herstellen.

20 Alternativ kann das Deckenelement eine Zwischenplatte, in welcher ein Durchbruch für die Kammer vorgesehen ist, und eine Abdeckplatte, welche zum Abdecken des Durchbruchs auf einer Seite der Zwischenplatte vorgesehen ist, umfassen. In diesem Fall umfasst also das Deckenelement zwei Platten, nämlich eine Zwischenplatte und eine Abdeckplatte. Dabei kann die Abdeckplatte auf der der Zwischenplatte zuge-

25 wandten Seite eine Aufnahme aufweisen. Damit wird dann die Form der Kammer durch die Ausnehmung in der Abdeckplatte und die Form des Durchbruchs bestimmt. Alternativ kann die Abdeckplatte keine Ausnehmung aufweisen, so dass die gesamte Ausnehmung des Deckenelements durch den Durchbruch bestimmt wird.

30 Die Zwischenplatte kann eine Kunststoffolie, insbesondere mit einer Dicke von  $1\mu\text{m}$  –  $1\text{mm}$ , sein.

Vorzugsweise kann die Membran zwischen der Abdeckplatte und der Zwischenplatte angeordnet sein. Auf diese Weise lässt sich die Membran insbesondere einfach mit

dem Substrat verbinden, indem sie beispielsweise zwischen die Abdeckplatte und die Zwischenplatte geklemmt wird und/oder mit wenigstens einer dieser beiden (Teil-) Platten durch Kleben, Ultraschallbonden oder Ähnlichem verbunden wird. Wenn die Abdeckplatte selbst noch eine Aufnahme aufweist, wird somit eine Teilkammer durch die Aufnahme in der Abdeckplatte gebildet und von der anderen Teilkammer, die durch den Durchbruch in der Zwischenplatte gebildet wird, mittels der Membran (Zwischenwand) getrennt.

Gemäß einer vorteilhaften Weiterbildung kann das Substrat ein Abdeckelement zum Abdecken der Ausnehmung umfassen. Dieses bildet die verbleibende Wand der Kammer, die durch die Ausnehmung, ob mit oder ohne Zwischenplatte, gebildet wird.

Vorteilhafterweise kann das Abdeckelement eine Kunststoffolie, insbesondere aus einem optisch hochwertigen Kunststoff und/oder mit einer Dicke von 50 µm bis 1 mm, sein. Zum einen lässt sich eine Kunststoffolie einfach mit dem Deckenelement verbinden und zum anderen lassen sich durch Verwendung einer Folie sehr geringe Dicken des Abdeckelements erzielen, was die Qualität von Mikroskopanalysen verbessert.

Vorzugsweise können die Zuführungen in die Deckfläche des Deckenelements des Substrats münden. Damit ist die Kammer bzw. sind die Teilkammern bezüglich der Flüssigkeitszugabe jeweils von oben zugänglich.

Gemäß einer vorteilhaften Weiterbildung kann weiterhin wenigstens ein Flüssigkeitsreservoir vorgesehen sein, welches auf dem Deckenelement des Substrats angeordnet ist und in welches eine Zuführung mündet. Ein solches Flüssigkeitsreservoir kann dazu dienen, größere Flüssigkeitsmengen an die Kammer abzugeben oder kann als Überlaufbecken fungieren, wenn es an der Mündung der Abflusszuführung angeordnet ist.

Vorzugsweise kann das wenigstens eine Flüssigkeitsreservoir aus einem Kunststoff, vorzugsweise dem selben Kunststoff wie das Deckenelement im Bereich der Zuführungsmündung, sein. Gemäß einer bevorzugten Weiterbildung können das Flüssigkeitsreservoir und das Deckenelement im Bereich der Zuführungsmündung als ein

Stück ausgebildet sein. Dies bedeutet, dass das Reservoir nicht mit dem Deckenelement beispielsweise verklebt oder verschraubt ist. Auf diese Weise lassen sich Dichtungen zwischen dem Reservoir und dem Deckenelement vermeiden und die Gefahr von Kontamination wird verringert.

5

Vorzugsweise kann das eine Stück ein Spritzgussteil sein. Dies erlaubt eine einfache Herstellung des Substrats.

10

Vorzugsweise kann das Substrat in einem Objektträger- oder Multititerformat ausgebildet sein.

Weitere Merkmale und Vorteile der Erfindung werden nachfolgend anhand der Beispiele und Figuren beschrieben:

15

Figur 1 zeigt eine Explosionsansicht einer Vorrichtung für Mikrofluiduntersuchungen mit einem Substrat mit einer Deckplatte und einer Zwischenplatte;

20

Figur 2a, 2b illustriert ein Beispiel einer Vorrichtung für Chemotaxis,

Figur 3a zeigt eine Explosionsansicht einer Vorrichtung für Mikrofluiduntersuchungen mit einer Deckplatte und einer am Boden der Kammer flächig anliegend lösbaren geordneten Membran;

Figur 3b zeigt eine Querschnittsansicht der Vorrichtung aus Figur 3a,

Figur 3c illustriert ein Verfahren mit der Vorrichtung nach den Figuren 3a und 3b.

30

In Figur 1 ist eine Vorrichtung für Mikrofluiduntersuchungen in einer Explosionsansicht gezeigt. Die Vorrichtung umfasst ein Substrat, welches wiederum ein Deckenelement mit einer Abdeckplatte 1 und einer Zwischenplatte 4 umfasst. In der Grundfläche der Abdeckplatte ist eine Ausnehmung 2a vorgesehen, deren Zuführungen (nicht gezeigt) jeweils in ein Flüssigkeitsreservoir 7 münden. Die Zwischenplatte 4 weist einen Durchbruch 2b auf. Dieser Durchbruch ist so ausgebildet, dass er einer-



seits unter der Ausnehmung 2a der Abdeckplatte liegt und andererseits Zuführungen aufweist, die bei den Öffnungen 6 in die Deckfläche des Abdeckelements 1 münden.

Weiterhin umfasst das Substrat ein Abdeckelement 5, welches insbesondere als Folie ausgebildet sein kann. Auch die Zwischenplatte 4 kann als Kunststoffolie ausgebildet sein. In Figur 1 ist eine Membran 3 zwischen der Abdeckplatte 1 und der Zwischenplatte 4 angeordnet, so dass nach Zusammenfügen und Verbinden der Abdeckplatte 1, der Zwischenplatte 4 und des Abdeckelements 5 zwei Teilkammern entstehen, welche durch die Membran 3 getrennt werden. Die beiden Teilkammern werden dabei jeweils durch die Ausnehmung 2a bzw. den Durchbruch 2b und die dazwischen angeordnete Membran 3 gebildet, so dass im Folgenden auch die Teilkammern mit 2a bzw. 2b bezeichnet werden.

Die Membran kann dabei einfach zwischen die Abdeckplatte 1 und die Zwischenplatte 4 geklemmt sein oder mit einer dieser oder beiden Platten verbunden sein, beispielsweise durch Kleben oder Ultraschallbonds.

Es können beispielsweise z.B. Cyclopor Track Etched Membranen von Whatman oder Filtermembranen von Millipore verwendet werden.

Die resultierende Vorrichtung für Mikrofluiduntersuchungen weist also eine Kammer auf, gebildet durch die Ausnehmungen 2a und dem Durchbruch 2b, die durch die Membran 3 in zwei Teilkammern in Form von Kanälen unterteilt wird. Jede der beiden Teilkammern weist eigene Zufluss- und Abflusszuführungen auf.

Die erfindungsgemäße Vorrichtung und insbesondere die in Figur 1 gezeigte Vorrichtung können insbesondere für Dialyseexperimente verwendet werden. Im Falle der in Figur 1 gezeigten Vorrichtung wäre die Teilkammer 2a der Dialysekanal und die Teilkammer 2b der Beobachtungskanal, die durch eine semipermeable Membran 3 voneinander getrennt sind. Der untere Beobachtungskanal 2b kann beispielsweise mit Suspensionskultur über eine der Öffnungen 6 und der obere Kanal 2a über die Reservoir 7 befüllt werden. Die Membran ist dann so gewählt, dass sie für Zellen undurchlässig aber für Biomoleküle wie z. B. Proteine und Salze durchlässig ist.

Durch die gezeigte Anordnung kann der Austausch durch die semipermeable Membran durch Diffusion oder Konvektion dominiert sein. Je größer die Kontaktfläche zwischen den beiden Teilkammern ist, desto schneller findet der Austausch statt.

- 5 Alternativ zu der gezeigten Ausführungsform, bei der die beiden Teilkammern parallel zueinander verlaufen und in einer Ebene senkrecht zur Grundfläche liegen, können die Teilkammern auch nebeneinander in einer Ebene parallel zur Grundfläche angeordnet sein.
- 10 In einer möglichen Anwendung werden adhärente Zellen in Kontakt mit einer Oberfläche (Wand) gebracht, an die Zellen durch spezifische Wechselwirkung an bestimmten Bindungsstellen adhären. Durch die Dialysemembran 3 wird eine Lösung gespült, die eine vorbestimmte Konzentration von Antikörpern hat. Die Antikörper sind so gewählt, dass sie spezifisch an die Bindungsstellen der Zellen binden. Die Antikörper konkurrieren mit den extrazellulären Bindungsmolekülen der Zellen um die auf einer
- 15 Wand immobilisierten Bindungsstellen, was bei einer ausreichenden Antikörperkonzentration zu einem Ablösen der Zellen führt. Im Gegensatz zu herkömmlichen Zellkulturgefäßen bzw. Mikroskopieträgern kann man nun die Antikörper über die Dialysemembran so weit verdünnen, dass die Zellen wieder die Möglichkeit besitzen, an
- 20 der Oberfläche zu adhären. Damit lässt sich beispielsweise die Reversibilität von Bindungen von Zellen untereinander anhand von Zell-Substrat-Wechselwirkungen studieren.
- 25 In einer weiteren Anwendung können Zellen in Suspensionskulturen untersucht werden. Zellen in Suspensionskultur werden im Allgemeinen durch Zentrifugieren, anschließende Abnahme des Überstandes und Re-Suspension von Inhaltsstoffen des Puffers bzw. der Nährlösung in gereinigter Form erhalten. Für eine wirksame Reinigung ist es häufig nötig, diese Arbeitsschritte mehrmals zu wiederholen.
- 30 Durch die Verwendung der gezeigten Vorrichtung ist es möglich, Zellen in Suspensionskultur mit bestimmten Stoffen in Verbindung zu bringen oder das Zellmedium von diesen zu befreien. Beispielsweise können Zellen in Suspensionskultur in dem Beobachtungskanal 2b mit Stoffen versorgt werden, die durch eine im Dialysekanal 2a wachsende Zellkultur produziert werden, wobei die beiden Zellkulturen nicht miteinan-

der vermischt werden. Diese Technik kann beispielsweise verwendet werden, wenn schlecht wachsende Zellen die Stoffe von sog. Fütterzellen benötigen, um besser *in vitro* kultiviert werden zu können. Die Fütterzellen können durch die unabhängige Fluidansteuerung beider Teilkammern jederzeit entfernt und wieder hinzugefügt werden, um etwa Kreuzreaktionen mit dem eigentlichen Experiment zu vermindern.

In einer weiteren Anwendung kann die in Figur 1 gezeigte Vorrichtung verwendet werden, um ein Modellsystem für Sepsis zu bilden. Dabei wird eine humane Zellkultur im Beobachtungskanal und eine Bakterienkultur im Dialysekanal 2a gezüchtet. Die humanen Zellen werden durch die Bakterien vergiftet. Mit der gezeigten Vorrichtung lässt sich untersuchen, mit welchen Medikamenten man bei bestimmter Bakterien- dichte die humanen Zellen am Leben erhalten kann.

Zusätzlich zu den genannten Anwendungen kann die Membran in einer solchen Vorrichtung für Migrationsstudien, insbesondere für Chemotaxis-Untersuchungen, verwendet werden. Bei der Chemotaxis bewegen sich Zellen in einem chemischen Konzentrationsgradienten. Dabei kann zwischen horizontaler Chemotaxis (parallel zur Membran) und vertikaler Chemotaxis (senkrecht zur Membran) unterschieden werden.

Bei der horizontalen Chemotaxis werden in eine Teilkammer Zellen eingebracht, die auf der Oberfläche der Membran adhären. In die andere Teilkammer wird eine Lösung mit einer bestimmten Chemikalie (beispielsweise C-AMP) eingefüllt. Durch die Poren der Membran diffundiert die Lösung aus der zweiten in die erste Teilkammer und bildet dort einen radialen Konzentrationsgradienten um die Pore. Die Reaktion der dort befindlichen Zellen auf den Konzentrationsgradienten kann dann untersucht werden. Für dieses Experiment weist die Membran vorzugsweise eine oder mehrere Poren mit vorbestimmtem Porendurchmesser und vorbestimmtem Lochabstand auf.

Für solche Chemotaxis-Untersuchungen kann eine Membran nur eine Pore bzw. ein Loch in der Größe von 1nm bis 30 µm aufweisen. In diesem Fall können auf einer Seite der Membran (z. B. unterhalb der Membran) Zellen in einem Haltemedium vorgesehen sein. Beispielsweise können Zellen in Agar oder Agarose eingebracht sein. Statt Agar oder Agarose können auch andere Haltemedien verwendet werden. Die

Haltemedien dienen u.a zur Verbesserung der optischen Analyse der Zelldynamik. Auf der anderen Seite der Membran (bspw. oberhalb der Membran) können ebenfalls in ein Haltemedium eingebettete Moleküle (Chemotaxine) vorgesehen sein. Dadurch muss für die Untersuchung keine Mikropipette mit einer Druckkontrolle verwendet werden, da die Konzentration der Chemotaxine, je nach Volumen des Haltemediums konstant bleibt, wenn die Chemotaxine durch das Loch diffundieren. Durch Diffusion dieser Chemotaxine von der ersten Seite der Membran durch das Loch auf die zweite Seite der Membran entsteht ein räumlich und zeitlich definierter Konzentrationsgradient auf der zweiten Seite der Membran. Somit kann untersucht werden, wie und ob die auf der zweiten Seite eingebetten Zellen auf den Konzentrationsgradienten reagieren. Die Membran ist vorzugsweise luftdurchlässig.

In Figuren 2a und 2b ist ein mögliches Beispiel einer entsprechenden Vorrichtung dargestellt. Grundsätzlich ist für diese Untersuchung keine Verwendung einer Flusskammer nötig. In Figur 2a ist ein entsprechender Aufbau in Explosionsansicht gezeigt. Auf einer Grundplatte 15 ist ein mit einem Haltemedium für Zellen (z.B. Agarose) benetzter Bereich aufgebracht. In diesem Bereich befinden sich auch die zu untersuchenden Zellen. Eine Membran 17 mit nur einem Loch 18 trennt diesen Bereich von dem mit Chemotaxinen angereicherten Haltemedium 19. Figur 2b zeigt den zusammengesetzten Analyseträger.

Solche Haltemedien können allerdings auch in einer Vorrichtung gemäß der Erfindung vorgesehen sein. Dazu können die Haltemedien jeweils in den Teilkammern, die durch die Membran getrennt sind, vorgesehen sein. Beispielsweise kann die Membran die Ober- und Unterseite von zwei in einem Substrat angeordneten Kanälen darstellen, analog zu dem in Fig. 1 gezeigten Beispiel. Alternativ können auch mehrere, typischerweise 2 – 96, durch Membranen mit einem Loch getrennte Reservoirs als Töpfchen auf einem Träger oder durch einen Kanal in einem Träger vorgesehen sein.

Bei der vertikalen Chemotaxis wird die Migration von Zellen in einem chemischen Konzentrationsgradienten durch eine Membran untersucht. In einer typischen Anwendung kann beispielsweise ein homogener Zellrasen (Zelltyp A) auf einer porösen Membran gezüchtet werden. Durch die Erzeugung eines Konzentrationsgradienten

(Befüllen der anderen Teilkammer mit einem Lösungsmittel) kann die Wanderung eines weiteren Zelltyps (Zelltyp B) durch den Zellrasen analysiert werden.

Die Konzentration des Zelltyps B in der zweiten Teilkammer kann beispielsweise durch Fluoreszenz-Techniken nachgewiesen werden. Weiterhin kann die Lösung im zweiten Kanal nach einer bestimmten Zeit entnommen und die Konzentration des Zelltyps B bestimmt werden. Untersuchungen von Leukozyten-Wanderungen durch verschiedene Zelllayer in Abhängigkeit von der Konzentration unterschiedlicher Substanzen und der Zelllayer können somit durchgeführt werden. In diesem Fall liegt der Porendurchmesser vorzugsweise bei 0,5 bis 20  $\mu\text{m}$ .

In Figur 3 ist ein weiteres Beispiel einer Vorrichtung für Mikrofluiduntersuchungen in Explosionsansicht gezeigt. Hier umfasst das Substrat eine Deckplatte 8 und eine Bodenfolie 9, die als Abdeckelement fungiert. In der Deckplatte 8 ist eine Ausnehmung 2a vorgesehen, welche die Kammer bildet.

In dem gezeigten Beispiel weist die Kammer nur zwei Zuführungen auf, wobei eine der Zuführungen in ein auf der Deckplatte angeordnetes Flüssigkeitsreservoir 7 mündet und die andere in die Auslassöffnung 13 mündet.

Weiterhin ist eine Membran 3 vorgesehen, die in dem Bereich 10a mit der Folie 9 und in dem Bereich 10b mit der Deckplatte 8 verklebt ist. Wie in der Figur zu sehen ist, wird die Membran 3 entlang ihres gesamten Randes mit der Deckplatte 8 verklebt, während die Membran an der dem Reservoir 7 zugewandten Seite nicht mit der Folie 9 verklebt ist. Dies bedeutet, dass eine durch das Reservoir 7 eintretende Flüssigkeit die Membran 3 passieren muss, bevor sie die Auslassöffnung 13 erreicht.

Solange keine Flüssigkeit über das Reservoir 7 in die Kammer gefüllt wird liegt die Membran zwischen den Klebebereichen flächig an der Folie 9 an.

Durch die Membran 3 wird die Kammer in zwei Teilkammern unterteilt, wobei die erste Teilkammer auf der Seite des Zuflusses und die zweite Teilkammer auf der Seite des Abflusses liegt. Die Membran ist mit der Deckplatte 8 derart verbunden, dass die gesamte Flüssigkeit, die durch das Flüssigkeitsreservoir 7 eingefüllt wird, durch die

Membran strömen muss, um durch die Teilkammer 2a zum Auslass 13 zu gelangen. Durch das Befüllen über das Reservoir 7 wird die Membran von unten mit Druck beaufschlagt, löst sich von der Bodenfolie 9 und wird nach oben gedrückt. Vorzugsweise ist daher die Membran elastisch ausgebildet. Dies ist in Figur 3b in Seitenansicht und  
 5 in Figur 3c in dreidimensionaler Ansicht gezeigt.

In den gezeigten Figuren ist die zu untersuchende Lösung vor dem Filtern durch die Membran mit 12a und nach dem Filtern mit 12b bezeichnet.

- 10 Wenn sich beispielsweise in der Lösung Bakterien finden, welche die Membran 3 nicht passieren können, lagern sie sich in dem Bereich 14 der Membran an. Die gefilterte Lösung kann durch den Auslass 13 entweichen. Nach dem Durchspülen mit Flüssigkeit legt sich die Membran 3 wieder an die Bodenfolie 9 und kann von unten mikroskopisch analysiert werden. Die Bakterien können beispielsweise mit FISH (Fluoreszenz-in-Situ Hybridisierung) angefärbt werden.  
 15

- Handelt es sich bei der zu analysierenden Flüssigkeit um Blut, Schlamm oder andere Proben, bei denen die Bakterien von anderen festen Bestandteilen getrennt werden müssen, kann die Oberfläche der Membran so modifiziert bzw. funktionalisiert sein,  
 20 dass die Bakterien daran adhären. Vorzugsweise ist dann allerdings für die untere Teilkammer eine zusätzliche Auslassöffnung vorgesehen, die verschließbar ist. Durch diese Auslassöffnung kann dann der untere Kanal gespült werden, um die genannten anderen festen Bestandteile zu entfernen.

- 25 Vorzugsweise weist die Membran bei der erfindungsgemäßen Vorrichtung eine große Fläche auf, um ein schnelles Durchspülen zu ermöglichen. In diesem Fall ist allerdings auch der zu mikroskopierende Bereich der Membran (Analysefläche) verhältnismäßig groß. Aus diesem Grund kann die erfindungsgemäße Vorrichtung, insbesondere die Beispiele in den Figuren, eine weitere Kammer aufweisen. Dabei werden  
 30 dann die zu untersuchenden Teilchen, wie zuvor beschrieben, an der ersten Membran gefiltert und anschließend durch einen Rückspülvorgang, bei dem ein Fluss in entgegengesetzter Richtung angelegt wird, in einem weiteren Filter (Analysefilter) aufgefangen. Dieser hat vorzugsweise eine geringere Fläche und kann somit einfacher mikroskopisch betrachtet werden.

Die weitere Kammer ist vorzugsweise über eine verschließbare Öffnung (beispielsweise mit einem Ventil) mit der entsprechenden Teilkammer verbunden, so dass erst nach Öffnen der verschließbaren Öffnung (zum Beispiel durch Beaufschlagen des Ventils mit einem vorbestimmten Druck durch den Rückspülvorgang), die Flüssigkeit, dann nur noch die tatsächlich zu untersuchenden Partikeln enthält, in die weitere Kammer gespült wird. Diese Bakterien werden dann an der zusätzlichen Analysemembran gefiltert und können dort mikroskopisch untersucht werden. Alternativ kann die Analysemembran in einen Deckel integriert sein, mit dem die Zuflussöffnung verschlossen werden kann.

Bei Ausführungsformen, die zwei Zuführungen für eine Teilkammer umfassen, wie beispielsweise in Figur 1 gezeigt ist, kann die Flüssigkeitszufuhr in eine Teilkammer durch die beiden Zuführungen gleichzeitig erfolgen. In diesem Fall sammeln sich die gefilterten Partikel hauptsächlich an dem Bereich der Membran, der in der Mitte zwischen den beiden Zuführungen liegt. An dieser Stelle kann dann eine Analyse der Partikel vorgenommen werden.

Für die verschiedene Anwendungen können die Oberflächen der Membran und/oder der Kammer funktionalisiert sein. Beispielsweise kann ein verbessertes Zellwachstum auf der Membran oder auf einer der Kammerinnenseiten bzw. -wände durch eine entsprechende Behandlung der Oberfläche erreicht werden. Insbesondere kann eine Beschichtung mit Polyelektrolytfilmen erfolgen, die typische Dicken im Bereich von 5 nm bis 100 nm haben. Die Beschichtungen können aus unterschiedlichen Polyelektrolytfilmen wie PAA, PEI und PSS bestehen. Insbesondere kann jeweils eine Basis-schicht aus einem dieser Materialien bestehen. Auf diese Schichten können direkt Biomoleküle wie Proteine oder DNA aufgebracht werden. Eine solche nicht-kovalente Bindung ist auch bei Anlegen eines Flusses im Kanal stabil.

Auch unspezifische oder spezifische Adhäsionsfaktoren für Moleküle oder Zellen (z.B. RGD-Peptide) können in dem Schichtaufbau, insbesondere in der zuletzt aufgetragenen Schicht, aufgebracht werden. Die zuletzt aufgetragene Schicht kann funktionelle Gruppen wie COOH oder NH<sub>2</sub> enthalten. Diese können zum kovalenten Koppeln von Biomolekülen verwendet werden.

Nach dem Binden von Biomolekülen auf die oberste Polyelektrolytschicht kann eine weitere Schicht zum Blocken unspezifischer Bindungen aufgebracht werden. Dabei kann es sich um eine weitere Polyelektrolytschicht, eine Lipidmembran oder um ein Blockingmolekül wie BSA, Gelatine oder DNA handeln. Das aufgebrachte Biomolekül sollte dabei seine Bindungsfähigkeit erhalten.

Weiterhin können auch strukturierte Polyelektrolytschichten vorgesehen werden. Dies kann beispielsweise durch das Spotten von Polyelektrolytschichten erfolgen, was es dann ermöglicht, Biomoleküle oder Zellen an speziellen Bereichen der Kammer oder der Membran zu binden.

Zusätzlich können unterschiedliche Bereiche oder die verschiedenen Teilkammern mit unterschiedlichen Polyelektrolytschichten verwendet werden.

Ein Beschichten kann beispielsweise durch Lösen eines Polyelektrolyts in wässriger Lösung (ca. 0,1 mg/ml bis 10 mg/ml) bei neutralem pH erfolgen. Diese Lösung wird dann in die Kammer eingespült und dort über einen vorbestimmten Zeitraum (beispielsweise 10 Minuten bis 2 Stunden) bei Raumtemperatur inkubiert. Auf diese Weise können zwischen einer und zwanzig Schichten aufgebracht werden.



## Patentansprüche

- 5 1. Vorrichtung für Mikrofluiduntersuchungen mit einem Substrat mit planer Grundfläche und Deckfläche, wobei
- 10 in das Substrat eine Kammer zur Flüssigkeitsaufnahme mit wenigstens zwei Zuführungen integriert ist und
- in der Kammer eine halbdurchlässige oder durchlässige Membran (3) angeordnet ist, wobei die Kammer durch die Membran in zwei Teilkammern (2a; 2b) mit jeweils wenigstens einer Zuführung unterteilt wird.
- 15 2. Vorrichtung nach Anspruch 1, wobei die Teilkammern wenigstens teilweise parallel zueinander angeordnet sind.
3. Vorrichtung nach Anspruch 1 oder 2, wobei die Teilkammern in einer Ebene parallel oder senkrecht zur Grundfläche des Substrats angeordnet sind.
- 20 4. Vorrichtung nach einem der vorangegangenen Ansprüche, wobei die Membran wenigstens teilweise in einer Ebene parallel oder senkrecht zur Grundfläche des Substrats angeordnet ist.
- 25 5. Vorrichtung nach einem der vorangegangenen Ansprüche, wobei die Membran flexibel, vorzugsweise elastisch, ist.
6. Vorrichtung nach einem der vorangegangenen Ansprüche, wobei die Membran wenigstens teilweise mit dem Boden der Kammer verbunden ist.
- 30 7. Vorrichtung nach einem der vorangegangenen Ansprüche, wobei wenigstens ein Teil der Membran an einem Teil der Kammerwand, insbesondere dem Boden der Kammer, flächig anliegend lösbar angeordnet ist.

8. Vorrichtung nach einem der vorangegangenen Ansprüche, wobei die Membran wenigstens eine Pore aufweist, wobei jede Pore einen Porendurchmesser in einem vorbestimmten Teilbereich des Bereichs von 1 nm – 20 µm, vorzugsweise 0,5 µm – 20 µm, aufweist.
9. Vorrichtung nach einem der vorangegangenen Ansprüche, wobei die Membran ein optisch hochwertiges Material umfasst.
10. Vorrichtung nach einem der vorangegangenen Ansprüche, wobei die Kammer wenigstens vier Zuführungen umfasst und durch die Membran in zwei Teilkammern mit jeweils wenigstens zwei Zuführungen unterteilt wird.
11. Vorrichtung nach einem der vorangegangenen Ansprüche, wobei die Membran und/oder eine Kammerwand eine Oberflächenfunktionalisierung aufweist.
12. Vorrichtung nach Anspruch 11, wobei die Oberflächenfunktionalisierung eine Beschichtung, insbesondere mit wenigstens einem Polyelektrolytfilm, einem Adhäsionsfaktor, einer funktionellen Gruppe, einem Biomolekül, einer Lipidmembran, einem Zellrasen und/oder einem Blockingmolekül, umfasst.
13. Vorrichtung nach einem der vorangegangenen Ansprüche, wobei das Substrat einen Kunststoff, insbesondere einen optisch hochwertigen und/oder einen optisch nicht transparenten Kunststoff, umfasst.
14. Vorrichtung nach einem der vorangegangenen Ansprüche, wobei das Substrat ein Deckenelement umfasst, in dessen Grundfläche eine Ausnehmung für die Kammer vorgesehen ist.
15. Vorrichtung nach Anspruch 14, wobei das Deckenelement eine Deckplatte (8) ist.
16. Vorrichtung nach Anspruch 14, wobei das Deckenelement eine Zwischenplatte (4), in welcher ein Durchbruch (2b) für die Kammer vorgesehen ist, und eine

Abdeckplatte (1), welche zum Abdecken des Durchbruchs auf einer Seite der Zwischenplatte vorgesehen ist, umfasst.

17. Vorrichtung nach Anspruch 15 oder 16, wobei die Membran zwischen der Abdeckplatte und der Zwischenplatte angeordnet ist.

18. Vorrichtung nach einem der Ansprüche 14 – 17, wobei das Substrat ein Abdeckelement (5; 9) zum Abdecken der Ausnehmung umfasst.

19. Vorrichtung nach Anspruch 18, wobei das Abdeckelement eine Kunststoffolie, insbesondere aus einem optisch hochwertigen Kunststoff und/oder mit einer Dicke von 50 µm – 1 mm, ist.

20. Vorrichtung nach einem der Ansprüche 14 – 19, wobei die Zuführungen in die Deckfläche des Deckenelements des Substrats münden.

21. Vorrichtung nach Anspruch 20, wobei weiterhin wenigstens ein Flüssigkeitsreservoir (7) vorgesehen ist, welches auf dem Deckenelement des Substrats angeordnet ist und in welches eine Zuführung mündet.

22. Vorrichtung nach Anspruch 21, wobei das wenigstens eine Flüssigkeitsreservoir aus einem Kunststoff, vorzugsweise dem selben Kunststoff wie das Deckenelement im Bereich der Zuführungsmündung, ist.

23. Vorrichtung nach Anspruch 21 oder 22, wobei das Flüssigkeitsreservoir und das Deckenelement im Bereich der Zuführungsmündung als ein Stück ausgebildet sind.

24. Vorrichtung nach Anspruch 23, wobei das eine Stück ein Spritzgussteil ist.

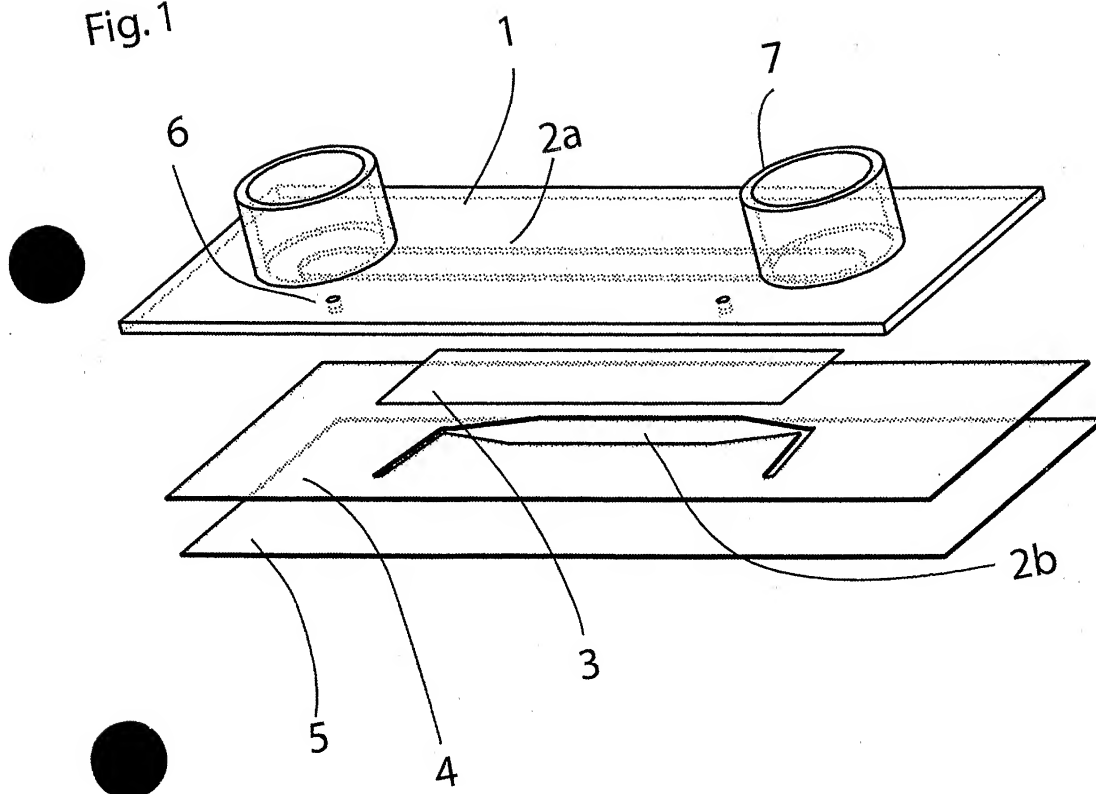
25. Vorrichtung nach einem der vorangegangenen Ansprüche, mit einer weiteren Kammer, welche mit einer der Teilkammern über eine verschließbare Öffnung verbunden ist, und mit einer weiteren Zuführung, wobei in der weiteren Kammer eine weitere Membran angeordnet ist, durch welche die weitere Kammer

zwischen der verschließbaren Öffnung und der weiteren Zuführung in zwei Teilkammern unterteilt ist.

## Zusammenfassung

- 5 Die Erfindung betrifft eine Vorrichtung für Mikrofluiduntersuchungen für ein Substrat mit planer Grundfläche und Deckfläche, wobei in das Substrat eine Kammer zur Flüssigkeitsaufnahme mit wenigstens zwei Zuführungen integriert ist und in der Kammer eine halbdurchlässige oder durchlässige Membran angeordnet ist, wobei die Kammer durch die Membran in zwei Teilkammern mit jeweils wenigstens einer Zuführung unterteilt wird.

Fig. 1



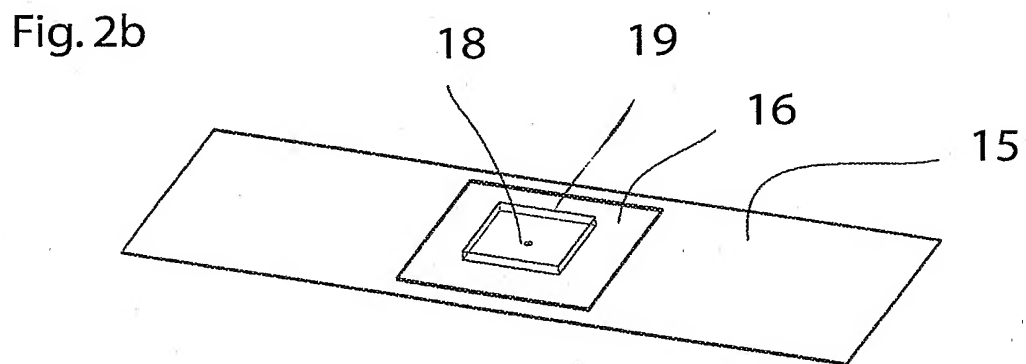
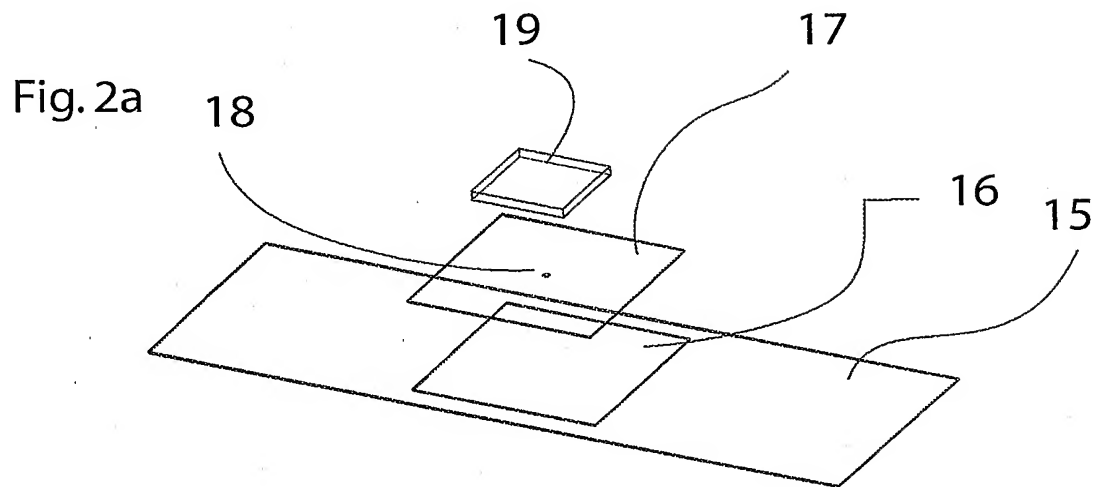


Fig. 3a

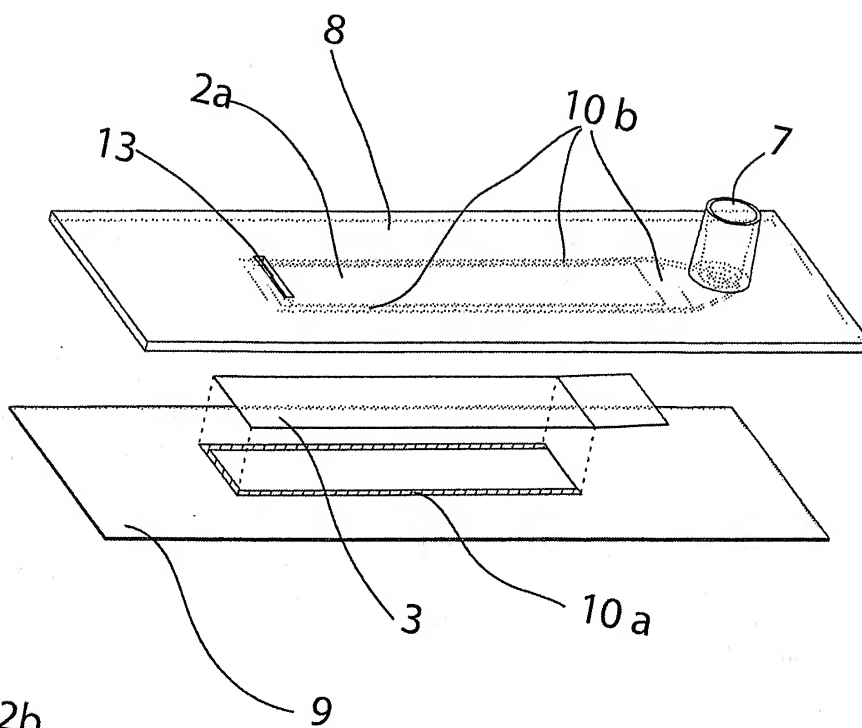


Fig. 3b

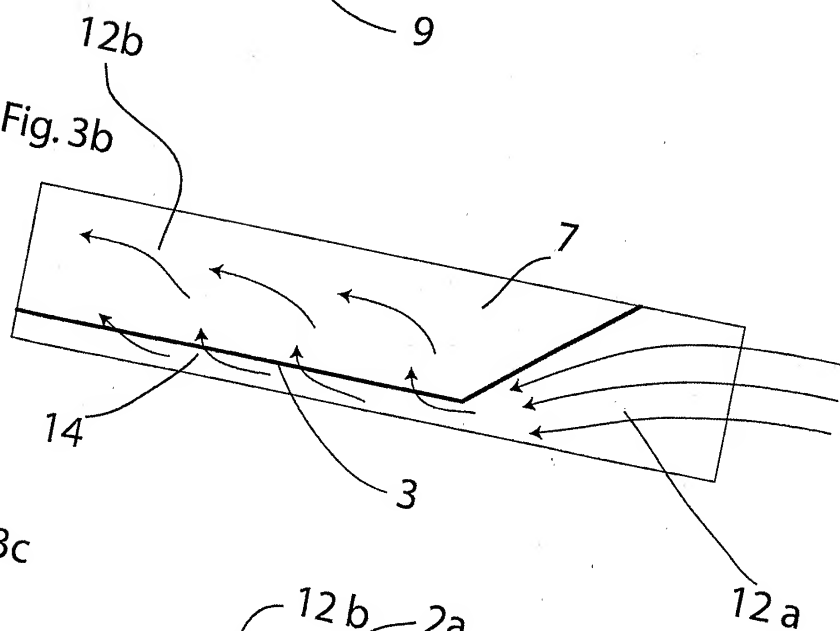


Fig. 3c

